

短報

## 2012/13シーズンに分離されたインフルエンザウイルスの抗原性及び系統解析

吉富秀亮・石橋哲也・中村朋史・世良暢之

福岡県における2012/13シーズンのインフルエンザ流行の原因ウイルスはインフルエンザウイルスA/H3亜型及びインフルエンザウイルスB型であった。同シーズンに当所で分離されたインフルエンザウイルスA/H3亜型67株及びインフルエンザウイルスB型1株について抗原性解析を行った。HI試験の結果、解析されたインフルエンザウイルスA/H3亜型及びインフルエンザウイルスB型の大半はワクチン類似株であることが推察された。さらに詳細な系統解析を行った結果、インフルエンザウイルスA/H3亜型はワクチン株A/Victoria/361/2011と同じサブクレード3Cであったが、インフルエンザウイルスB型はワクチン株B/Wisconsin/1/2010と異なるクレード3であった。

[キーワード：2012/13シーズン、インフルエンザ、HA試験、HI試験、系統解析]

### 1 はじめに

福岡県における2012/13シーズンのインフルエンザは、2012年第49週以降徐々に報告数が増加し、2013年第4週から第5週にかけてピークを迎えた。感染症発生动向調査事業において搬入されたインフルエンザ疑い症例について、当所はリアルタイムPCR法及びMDCK細胞を用いた分離培養法によってインフルエンザウイルスの同定を行った。その結果、インフルエンザ流行の原因ウイルスはインフルエンザウイルスA/H3亜型及びインフルエンザウイルスB型であった。そこで、インフルエンザ流行の実態解明を目的に、抗原性及び系統解析を行い、分離培養法によって得られたインフルエンザ分離株と2012/13シーズンに用いられたインフルエンザワクチン株との比較を行った。

### 2 材料と方法

#### 2・1 材料

2012年12月から2013年2月に感染症発生动向調査事業において搬入されたインフルエンザ疑い症例検体についてMDCK細胞を用いた分離培養を行い、分離できたインフルエンザウイルスA/H3亜型67株及びインフルエンザウイルスB型1株を材料とした。分離の確認はエスプラインインフルエンザ(富士レビオ社)により行った。分離株数の推移は図1に示す。

#### 2・2 抗原性解析

抗原性解析は合計68株の分離株について、国立感染症研究所(以下、感染研)が示す「インフルエンザ診断マニュアル(第2版)」<sup>1)</sup>に準拠し、赤血球凝集(HA)試験により分離株の力価を測定後、感染研から配布されたインフル

エンザウイルス同定用キット(A/California/7/2009、A/Victoria/361/2011、B/Wisconsin/1/2010(Yamagata系統)、B/Brisbane/60/2008(Victoria系統))を用いて血球凝集抑制(HI)試験を行った。HA試験及びHI試験には0.75%モルモット血球を用いた。

#### 2・3 系統解析

系統解析は当所で分離されたインフルエンザ株のうち、感染研において塩基配列を解析されたインフルエンザウイルスA/H3亜型2株(A/FUKUOKA/1/2012及びA/FUKUOKA/2/2012)及びインフルエンザウイルスB型1株(B/FUKUOKA/27/2013)のHA遺伝子領域の系統樹を塩基配列解析ソフトウェアMolecular Evolutionary Genetics Analysis(MEGA) version5を用いて作成することにより行った。分離株及び参照株のHA遺伝子領域の塩基配列は、インフルエンザ遺伝子情報バンクであるThe Global Initiative on Sharing All Influenza Data(GISAID)<sup>2)</sup>を通して入手した。インフルエンザウイルスA/H3亜型分離株は1023bp、インフルエンザウイルスB型分離株は1038bpについて、kimura-2-parameter法で塩基配列を整列し、近隣結合法(NJ法)により系統樹を作成した。

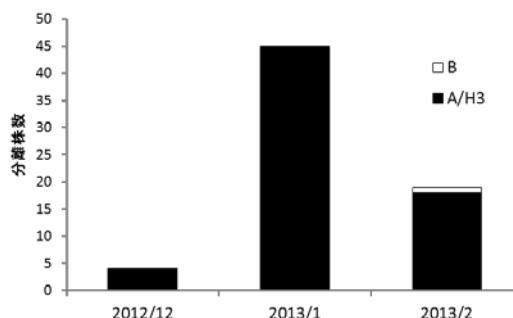


図1. インフルエンザウイルス分離株数の推移

表 1. インフルエンザウイルス同定用キットの HI 試験結果

標準株	抗血清			
	抗A/California/7/2009	抗A/Victoria/361/2011	抗B/Wisconsin/1/2010	抗B/Brisbane/60/2008
A/California/7/2009	1280	<10	<10	<10
A/Victoria/361/2011	<10	5120	<10	<10
B/Wisconsin/1/2010	<10	<10	160	<10
B/Brisbane/60/2008	<10	<10	<10	160

表 2. インフルエンザウイルス A/H3 亜型分離株の HA 試験結果

分離株数	HA価/50 $\mu$ L (0.75%モルモット血球)								
	<2	2	4	8	16	32	64	128	256
分離株数	29	5	6	20	4	2	1	0	1

### 3 結果及び考察

感染研より配布されたインフルエンザウイルス同定用キットのホモ価測定を行った結果、A/California/7/2009 の HI 価は 1280 倍、A/Victoria/361/2011 の HI 価は 5120 倍、B/Wisconsin/1/2010 の HI 価は 160 倍、B/Brisbane/60/2008 の HI 価は 160 倍であった(表 1)。

当所で分離されたインフルエンザウイルス A/H3 亜型分離株 67 株の HA 試験結果を表 2 に示す。HA 試験の結果、インフルエンザウイルス A/H3 亜型分離株のうち、HI 試験を行うことが可能な 8HA 価/50 $\mu$ L を有する分離株は、67 株中 27 株 (40%) であった。インフルエンザウイルス B 型分離株 1 株の HA 価は 256 倍であり、合計 28 株について HI 試験を行った。

HI 試験の結果を表 3 に示した。インフルエンザウイルス A/H3 亜型分離株の HI 価は 640 倍が 1 株、1280 倍が 12 株、2560 倍が 8 株、5120 倍が 6 株であった。ワクチン株 A/Victoria/361/2011 (ホモ価 5120 倍) と比較して抗原変異の目安となる 8 倍以上の差を示したのは 1 株 (FS171) であり、ワクチン類似株は 27 株中 26 株 (96%) であった。さらに、インフルエンザウイルス B 型分離株 1 株は抗 B/Wisconsin/1 /2010 に対し HI 価 160 倍であったことから Yamagata 系統であることが分かった。さらに、ワクチン株 B/Wisconsin/1 /2010 はホモ価 160 倍であったことから、インフルエンザウイルス B 型分離株 1 株はワクチン類似株であることが明らかになった。当所における抗原性解析の結果は、感染研における全国の地方衛生研究所において分離されたインフルエンザウイルス株の抗原性解析の結果<sup>3)</sup>と類似していた。

次に、インフルエンザウイルス A/H3 亜型分離株の系統解析の結果を図 2 に、インフルエンザウイルス B 型分離株の系統解析の結果を図 3 に示した。インフルエンザウイルス A/H3 亜型分離株である A/FUKUOKA/1/2012 及び A/FUKUOKA/2/2012 はサブクレード 3C に分類された。2012/13 シーズンのワクチン株 A/Victoria/361/2011 もサブクレード 3C に分類されたことから、A/FUKUOKA/1/2012 及び A/FUKUOKA/2/2012 の塩基配列はワクチン株に類似していたことが明らかになった。同様にインフルエンザウイ

ルス B 型分離株である B/FUKUOKA/27/2013 の解析を行った結果、B/FUKUOKA/27/2013 はクレード 2 に分類された。2012/13 シーズンのワクチン株である B/Wisconsin/01/2010 はクレード 3 に分類され、B/FUKUOKA/27/2013 とは異なるクレードであったことから、B/FUKUOKA/27/2013 の塩基配列はワクチン株に類似していなかったことが明らかになった。

抗原性解析及び系統解析の結果から、福岡県における 2012/13 シーズンのインフルエンザウイルス A/H3 亜型は抗原性及び塩基配列がワクチン株 A/Victoria/361/2011 に類似し、インフルエンザウイルス B 型はワクチン株 B/Wisconsin/1/2010 と抗原性は類似しているが塩基配列は類似していないことが明らかになった。しかし、今回の報告においてインフルエンザウイルス A/H3 亜型分離株の 67 株中 40 株 (60%) は 8HA 価/50 $\mu$ L 未満であり、HI 試験を行うことができなかった。今後の課題は分離株総数を増やすこと、及び 8HA 価/50 $\mu$ L 以上の分離株を安定的に分離する方法を構築することである。また、インフルエンザ B 型は 3 月までに 1 株しか分離されなかったため、B 型については詳細な傾向を明らかにすることはできなかった。4 月以降に分離されたウイルス株と併せて再評価を行う必要がある。

### 4 まとめ

福岡県における 2012/13 シーズンのインフルエンザウイルス A/H3 亜型は抗原性及び HA 遺伝子領域がワクチン株 A/Victoria/361/2011 に類似していたことが分かった。また、インフルエンザウイルス B 型はワクチン株 B/Wisconsin/1/2010 と抗原性は類似していたが HA 遺伝子領域は類似していないことが分かった。

### 4 謝辞

調査にあたり、検体採取にご協力いただいた医療機関及び各保健福祉環境事務所の関係各位に深謝致します。

表 3. インフルエンザウイルス分離株の HI 試験結果

分離株	継代数	抗血清			
		抗A/California/7/2009	抗A/Victoria/361/2011	抗B/Wisconsin/1/2010	抗B/Brisbane/60/2008
FS133	#1	<10	2560	<10	<10
FS134	#1	<10	2560	<10	<10
FS127	#2	<10	1280	<10	<10
FS136	#2	<10	1280	<10	<10
FS137	#2	<10	1280	<10	<10
FS139	#2	<10	5120	<10	<10
FS145	#1	<10	1280	<10	<10
FS152	#1	<10	1280	<10	<10
FS140	#2	<10	1280	<10	<10
FS171	#2	<10	640	<10	<10
FS172	#2	<10	5120	<10	<10
FS175	#2	<10	1280	<10	<10
FS179	#2	<10	2560	<10	<10
FS183	#2	<10	5120	<10	<10
FS184	#2	<10	1280	<10	<10
FS185	#2	<10	1280	<10	<10
FS186	#2	<10	1280	<10	<10
FS182	#2	<10	5120	<10	<10
FS190	#2	<10	5120	<10	<10
FS210	#2	<10	5120	<10	<10
FS216	#1	<10	<10	160	<10
FS239	#2	<10	2560	<10	<10
FS241	#2	<10	1280	<10	<10
FS242	#2	<10	2560	<10	<10
FS248	#2	<10	2560	<10	<10
FS249	#2	<10	1280	<10	<10
FS250	#1	<10	2560	<10	<10
FS232	#1	<10	2560	<10	<10

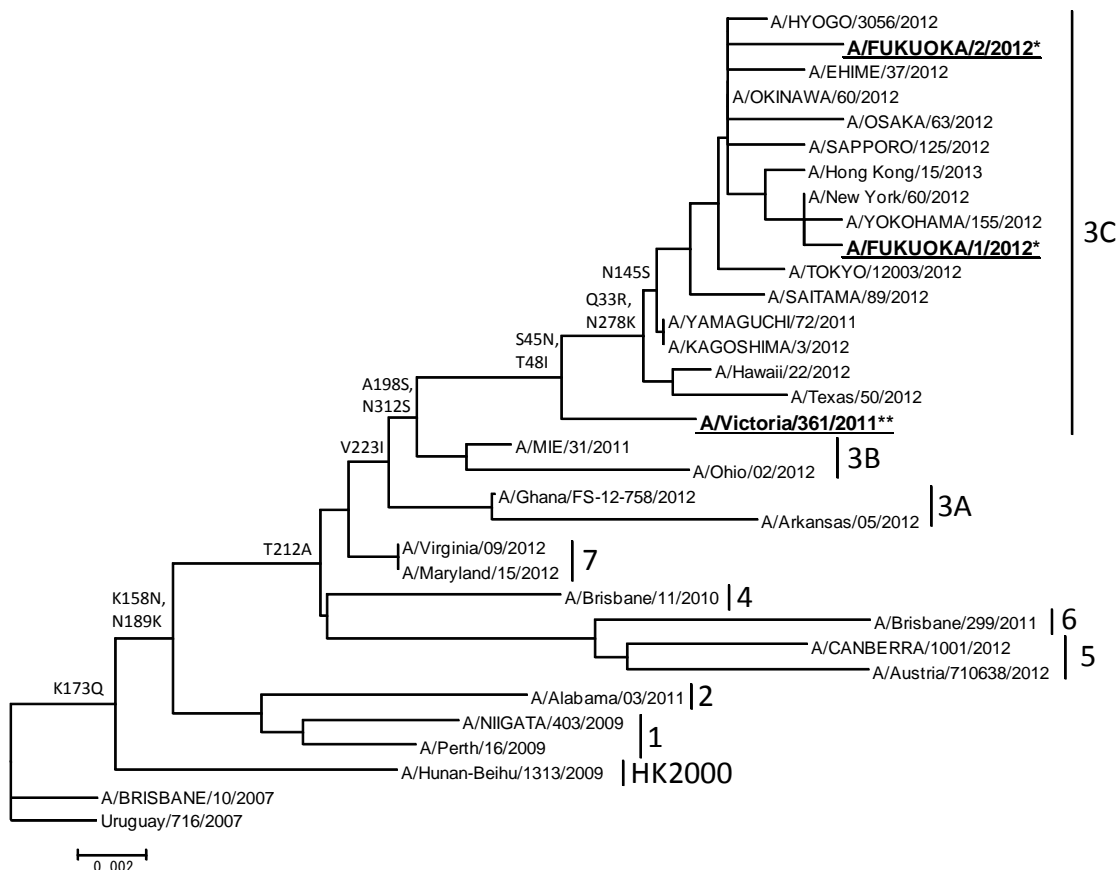


図 2. インフルエンザウイルス A/H3 亜型分離株の系統解析結果

(\* : 福岡県において分離した株、\*\* : 2012/13 シーズンのワクチン株)

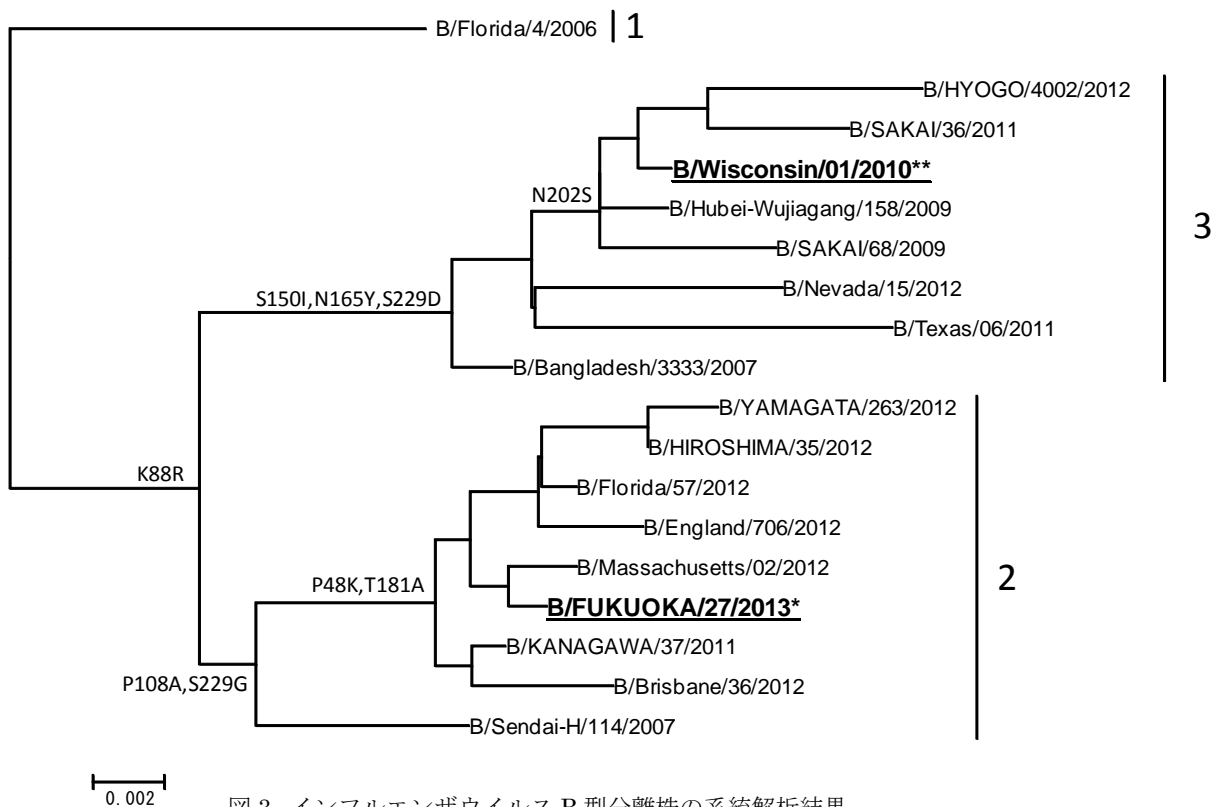


図 3. インフルエンザウイルス B 型分離株の系統解析結果  
 (\* : 福岡県において分離した株、\*\* : 2012/13 シーズンのワクチン株)

## 文献

- 1) 感染研：インフルエンザ診断マニュアル（第2版）
- 2) GISAID , <http://platform.gisaid.org/epi3/start>
- 3) IASR<速報>国内インフルエンザ流行株の抗原性解析  
 および薬剤耐性株の検出状況（途中経過）,  
<http://www.nih.go.jp/niid/ja/flu-m/flu-iasrs.html>

(英文要旨)

### Serologic and genetic characterization of influenza virus in 2012/13 in Fukuoka

Hideaki YOSHITOMI, Tetsuya ISHIBASHI, Tomofumi NAKAMURA, and Nobuyuki SERA

*Fukuoka Institute of Health and Environmental Sciences,  
 Mukaizano 39, Dazaifu, Fukuoka 818-0135, Japan*

We performed serologic analysis by Hemagglutination inhibition test. Among the isolates, 96% of influenza virus type A/H3 and influenza type B were similar to vaccine strain of 2012/13 season. From the results of phylogenetic analysis, epidemic influenza virus type A/H3 was classified into clade3C, same clade with vaccine strain. On the other hand, epidemic influenza virus type B was classified into clade3, different clade which vaccine strain located.

[Key words ; 2012/13 influenza season, Hemagglutination inhibition test, Phylogenetic analysis ]